

Influência da administração de extratos de duas plantas calcinogênicas sobre a fertilidade de ratos

(Effect of calcinogenic plant extracts on rat fertility)

J.R.B. Mello¹, A. Langeloh¹, G. Habermehl², H.C. Krebs², F.C. Bastos³

¹Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS
Rua Sarmiento Leite 500
90050-170 - Porto Alegre, RS

²Chemisches Institut der Tierärztliche Hochschule Hannover, Alemanha.

³Mestranda em Ciências Veterinárias da UFRGS.

Recebido para publicação, após modificação, em 23 de junho de 1999.

E-mail: Jmello@vortex.ufrgs.br

Apoio: PROBRAL - CAPES/DAAD, CNPq, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS

RESUMO

Investigou-se o efeito de extratos aquosos de *Solanum malacoxylon* (Sendter) Solanaceae (SM) (sin.: *S. glaucophyllum*) e *Nierembergia veitchii* (Hook) Solanaceae (NV), plantas calcinogênicas encontradas no Brasil, sobre a reprodução de ratos e sobre suas progênes. No experimento 1, ratos e ratas Wistar, em número variável conforme o grupo, receberam por via oral, durante os 40 dias anteriores ao acasalamento, extrato aquoso de ambas as plantas em dosagem equivalente à administração diária de 10,9g/kg-1 de planta seca. Os resultados foram comparados com os de um grupo tratado diariamente com vitamina D₃ (3,0mg/kg-1) e com os de um grupo-controle (salina). No experimento 2, ratas prenhes receberam, por via oral, três diferentes doses dos extratos de ambas as plantas (equivalente à administração diária de 5,4; 10,9 e 21,7g/kg-1 de planta seca), durante toda a gestação. Os resultados foram comparados com três grupos tratados com vitamina D₃ (0,75; 2,25 e 3,75mg/kg-1) e um grupo-controle (salina). Quando administradas antes da gestação, o ganho de peso das fêmeas e a fertilidade foram reduzidos nos grupos tratados com SM (11%) e vitamina D₃ (11%). No grupo tratado com NV, a fertilidade também foi reduzida (25%), mas o desenvolvimento ponderal durante o tratamento não foi afetado. Nos grupos tratados com SM e vitamina D₃ anterior à gestação, o número de filhotes por ninhada foi reduzido, assim como o seu peso ao nascer. Características de desenvolvimento e desempenho físico dos filhotes não foram afetados em nenhum dos grupos. O tratamento das fêmeas com extrato aquoso de SM durante a gestação causou redução significativa e dose-

dependente nas características reprodutivas estudadas. O mesmo foi observado com as fêmeas tratadas com vitamina D_3 . Com o extrato aquoso de NV não foram observadas reduções nas taxas reprodutivas, quando as fêmeas foram tratadas durante a gestação. Com as doses 10,9 e 21,7g/kg-1 de NV foram observadas anomalias morfológicas fetais (2,3 e 0,1%, respectivamente), também presentes nos filhotes de fêmeas tratadas com vitamina D_3 (2,25mg/kg-1). A presença de vitamina D_3 e seus metabólitos nas plantas calcinogênicas provavelmente é responsável pela infertilidade observada, não somente devido à toxicidade sistêmica, mas também devido aos seus efeitos específicos sobre o aparelho reprodutor.

Palavras-Chave: Planta tóxica, planta calcinogênica, infertilidade, *Solanum malacoxylon*, *Nierembergia veitchii*

ABSTRACT

The effect of aqueous extract of Solanum malacoxylon (Sendter) Solanaceae (SM) (sin.: S. glaucophyllum) and Nierembergia veitchii (Hook) Solanaceae (NV), common calcinogenic plants in Brazil, on the reproduction of rats and on their offsprings was investigated. In one set of experiments, male and female Wistar rats were treated per os with aqueous extract of each plant at a dose corresponding to the daily administration of 10g/kg-1 of dried plant for 40 days before mating. In another set of experiments, pregnant rats were daily treated with three different doses of aqueous extracts of both plants (5.4; 10.9 and 21.7g/kg-1, equivalent to the administration of dried plants) from the first until the last day of pregnancy. Saline and vitamin D_3 treated male, female and pregnant rats were used as control in both experimental procedures. When administered before the pregnancy, the weight gain and the fertility were reduced in groups treated with SM (11%) and vitamin D_3 (11%). In the NV group, fertility was reduced (25%) but the weight gain was not affected. The number of pups per litter and their weight were reduced in groups SM and vitamin D_3 , but in all groups the body development of the offsprings was not adversely affected. The treatment of the dams with SM during pregnancy causes significant and dose-related reduction of the fertility, as well as with vitamin D_3 . With an aqueous extract from NV it was not observed a significant reduction of the fertility, but the pups (2.3% in group treated with NV 10.9g/kg-1 and 0,1% in group treated with NV 21.7g/kg-1) presented morphological abnormalities, that were also observed with vitamin D_3 (2.25mg/kg-1) treatment. The presence of vitamin D_3 and metabolites in the calcinogenic plants is probably responsible for the infertility, not only because their systemic toxicity, but also because of the direct effects on the reproductive system.

Keywords: Plant poisoning, calcinogenic plant, infertility, Solanum malacoxylon, Nierembergia veitchii

INTRODUÇÃO

As plantas calcinogênicas são causadoras de intoxicações em animais domésticos de diversos países do mundo. Na Alemanha, Suíça e Áustria a planta *Trisetum flavescens* (Gramineae), aveia dourada, é responsável pelo quadro clínico conhecido como calcinose enzoótica, que atinge bovinos (Dirksen et al., 1973). Nos Estados Unidos a doença que atinge bovinos e eqüinos é causada pela ingestão da planta *Cestrum diurnum* (Solanaceae), jasmim-do-dia (Krook et al., 1975). No Brasil e Argentina a *Solanum malacoxylon* (Solanaceae) sinônimo *S. glaucophyllum*, espichadeira ou duraznilo blanco, é responsável pela ocorrência da doença em bovinos (Worker & Carrillo, 1967; Döbereiner et al., 1971). Outra planta Solanaceae, *Nierembergia veitchii*, flor branca, é calcinogênica para ovinos no Rio Grande do Sul (Riet Correa et al., 1987; Mello, 1991). Além dos sintomas clássicos da hipervitaminose D, como emagrecimento progressivo, inapetência, calcificação de tecidos moles, hipercalcemia, hiperfosfatemia, hiperplasia de células C da tireóide e osteopetrose, vários trabalhos relatam a ocorrência de infertilidade e dificuldades de concepção nos animais

mantidos em pastagens que contenham plantas calcinogênicas (Dirksen et al., 1973; Dämmrich et al., 1975; Mello et al., 1995).

Este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos da administração dos extratos aquosos de *Solanum malacoxylon* (Sendter) Solanaceae (SM) e de *Nierembergia veitchii* (Hook) Solanaceae (NV) sobre a fertilidade de ratos, quando administrados antes do acasalamento para machos e fêmeas e, num segundo momento, para fêmeas durante a gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

Solanum malacoxylon e *Nierembergia veitchii* foram colhidas no verão de 1995, nas regiões de Pelotas e Pinheiro Machado (RS), respectivamente. Amostras foram identificadas pelo Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UFRGS.

Os extratos aquosos foram obtidos de 500g de cada uma das plantas, moídas e secas, misturadas com 2 litros de água destilada, por 12 a 24 horas sob agitação. Esse procedimento foi repetido até a perda total da coloração do material vegetal. Os extratos foram filtrados, concentrados em rotavapor e armazenados sob refrigeração até sua administração por sonda gástrica. Para o protocolo I foi fixada uma dosagem equivalente ao extrato de 10,9g/kg-1 de planta seca. No protocolo II foram fixadas 3 dosagens de extrato, de cada uma das plantas, equivalente à massa de planta seca extraída: 5,4; 10,9 e 21,7g/kg-1.

Protocolo I

Foram utilizados ratos e ratas Wistar, criados e mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, com período de claro/escuro constante de 12 horas, temperatura de 21°C±2, alimentados com ração comercial (Nuvilab CR1 Nutrival, Colombo, PR) e água *ad libitum*. Os animais, divididos aleatoriamente em quatro tratamentos, receberam por sonda gástrica durante 40 dias pré-acasalamento: 1- solução fisiológica (5 machos e 15 fêmeas); 2- 3mg/kg-1 por dia de vitamina D₃ (Merck S.A., RJ) (3 machos e 9 fêmeas); 3- extrato aquoso de SM (3 machos e 9 fêmeas) e 4- extrato aquoso de NV (1 macho e 4 fêmeas) (equivalente a 10,9g de planta seca por kg, por dia, nos dois últimos tratamentos). Após esse período, os animais foram colocados em gaiolas de acasalamento na proporção de 1 macho para cada 3 fêmeas, durante 20 dias. Terminado o período de acasalamento as fêmeas foram assistidas por mais 23 dias, no mínimo, para acompanhamento do possível parto. Os filhotes nascidos foram acompanhados até o desmame (21 dias) para avaliação do seu desenvolvimento.

Avaliaram-se as características peso diário de machos e fêmeas, número de fêmeas gestantes, número de fêmeas paridas, número de filhotes vivos e mortos, número de filhotes deformados, peso da ninhada ao nascer, ocorrência e evolução de sintomas.

Os filhotes foram avaliados quanto a idade para descolamento das orelhas, aparecimento de penugem, aparecimento de pêlos, erupção de incisivos, abertura de ouvidos, abertura de olhos, descida de testículos e abertura do canal vaginal.

No 7º, 14º e 21º dias após o nascimento, os filhotes foram submetidos individualmente a um teste de natação, que consistia em colocá-los em um tanque com água aquecida (40°C), com altura suficiente para evitar que tocassem o fundo, para a tentativa de nadar. Cada animal era colocado para nadar três vezes, pelo período de 10 segundos, com intervalos de 10 minutos entre cada teste. Os filhotes recebiam escores de desempenho como se segue: 0 = nariz debaixo da água; 1 = nariz na superfície; 2 = nariz e topo da cabeça na superfície da água, mas orelhas abaixo dela; 3 = idem ao 2, mas com orelhas na superfície; 4 = mesmo que 3, mas com as orelhas acima da superfície da água.

Os resultados por animal e por grupo foram anotados, e os escores obtidos entre grupos, para fins de avaliação estatística.

Protocolo II

Machos e fêmeas, mantidos em condições idênticas às do protocolo I, foram acasalados por 12 horas (das 19 às 7 horas) na proporção de um macho para cada três fêmeas. Diariamente foi realizado exame de esfregaço vaginal para constatação de cópula, pela presença de tampão vaginal ou espermatozóides. Esse foi considerado o primeiro dia de gestação, e as fêmeas foram então individualizadas em gaiolas e passaram a receber por sonda gástrica, aleatoriamente, extrato aquoso de SM ou de NV (equivalente a 5,4; 10,9 e 21,7g de planta seca por kg, por dia), vitamina D₃ (0,75; 2,25 e 3,75mg/kg-1 por dia) e solução fisiológica (controle). O número de fêmeas por tratamento/dose variou entre 5 e 10.

Avaliaram-se as características número de fêmeas copuladas, número de fêmeas gestantes, número de fêmeas paridas, número de implantes uterinos no sétimo dia de gestação (constatado por laparotomia sob anestesia com éter etílico), número de filhotes vivos, número de abortos e/ou reabsorções, desenvolvimento ponderal de fêmeas e dos filhotes e ocorrência de deformações nos filhotes.

Foram calculadas as seguintes taxas reprodutivas: taxa de prenhez = (número de fêmeas com implantes uterinos / número de fêmeas com espermatozóides no esfregaço vaginal) \times 100; taxa de parto = (número de fêmeas que chegam ao parto aos 21-23 dias / número de fêmeas com implantes uterinos) \times 100; taxa de natalidade = (número de filhotes nascidos vivos / número total de filhotes nascidos vivos ou mortos) \times 100, e taxa de teratogenia = (número de filhotes com deformações macroscópicas externas / número de filhotes nascidos) \times 100.

Fez-se análise de variância das características quantitativas e usou-se teste qui-quadrado para as taxas reprodutivas (Snedecor & Cochran, 1967).

RESULTADOS

Protocolo I

Durante a administração de extratos de SM, NV, vitamina D₃ e solução fisiológica (SF) houve redução do peso corporal, tanto de machos quanto de fêmeas tratados com SM e vitamina D₃. Essa redução não foi observada em machos e fêmeas tratados com NV e SF. A deterioração do estado geral nos grupos tratados com SM e com vitamina D₃ teve início já nos primeiros dias de tratamento. Foram observados emagrecimento progressivo, pelo arrepiado, andar relutante, respiração dificultada e arqueamento da coluna e de ossos longos. Em alguns casos, a gravidade dos sintomas era intensa.

Durante o período de acasalamento, as fêmeas tratadas com SM e com vitamina D₃, que apresentavam redução do ganho de peso no período de tratamento, passaram a apresentar uma curva de desenvolvimento ponderal semelhante à obtida com NV. Nos três grupos houve tendência de manutenção do peso durante este período. As fêmeas tratadas com SF tiveram desenvolvimento ponderal positivo. Nos machos houve maior desenvolvimento ponderal após cessar a administração oral, em todos os grupos.

Nos 20 dias subsequentes ao período de acasalamento, quando se previam as partições, houve elevado percentual de fêmeas gestantes no grupo SF (Tab. 1), observando-se aumento do peso corporal, característico do período de gestação, e queda brusca a partir do dia 21-22, devido ao parto. Nos demais grupos não foram observadas tais elevações e reduções, uma vez que só uma fêmea ficou gestante em cada grupo.

Tabela 1. Características reprodutivas em ratos Wistar tratados durante 40 dias prévios ao acasalamento com extratos de *Solanum malacoxylon* (SM) e de *Nierembergia veitchii* (SV), com vitamina D₃ e com solução fisiológica por administração oral, segundo as doses indicadas.

Tratamento	Fêmea (n)	Macho (n)	Fêmea parida		Filhotes por ninhada (n)	Peso médio ao nascer (g)
			(n)	(%)		
SM (10,9g/kg/dia)	9	3	1	11*	9	49,5
NV (10,9g/kg/dia)	4	1 ^a	1	25*	13	65,2
Vitamina D ₃ (3mg/kg/dia)	9	3	1	11*	8	37,4
Solução fisiológica	15	5	14	93*	10,8	56,2

^a No grupo foi observada a proporção de 1 macho para 4 fêmeas.

*P<0,05

Os extratos aquosos de SM e NV, quando administrados 40 dias antes do período de acasalamento, reduziram significativamente o percentual de fêmeas paridas em 11 e 25%, respectivamente. Resultado semelhante foi observado com o grupo tratado com vitamina D₃. O tratamento com solução fisiológica resultou em 93% de parições.

Não houve diferença no período de aparecimento das características de desenvolvimento dos filhotes dos grupos SM, NV e vitamina D₃ em relação aos filhotes do grupo-controle (SF) (Tab. 2). Quanto ao desempenho no teste de natação, também não houve diferença entre os grupos experimentais e o grupo-controle (Tab. 3).

Tabela 2. Tempo médio (dias) para o aparecimento das características de desenvolvimento de filhotes do acasalamento de ratos Wistar tratados por 40 dias pré-acasalamento com extratos de *Solanum malacoxylon* e de *Nierembergia veitchii*, com vitamina D₃ e com solução fisiológica, segundo as doses indicadas.

Característica	SM ^a (10,9g/kg/dia)	NV ^a (10,9g/kg/dia)	Vitamina D ₃ ^a (3mg/kg/dia)	Sol. fisiológica
Descolamento de orelhas	3,4±0,4	3,2±0,4	3,0±0,4	3,6±0,4
Aparecimento de penugem	4,8±0,2	5,0±0,2	4,8±0,2	5,2±0,2
Aparecimento de pêlos	8,6±0,8	9,2±0,8	8,8±0,8	9,0±0,6
Erupção de incisivos	9,0±1,0	9,2±0,8	8,6±0,8	9,2±1,0
Abertura de ouvidos	13,6±0,8	13,8±0,8	13,0±0,8	14±1,0
Abertura de olhos	14,2±0,8	14,0±0,8	13,8±0,4	14,4±1,0
Descida de testículos	18,0±1,2	17,4±1,0	16,8±1,0	16,4±1,0
Abertura de canal vaginal	38,2±2,0	36,7±1,8	36,2±1,2	37,1±1,8

^a Valores obtidos da única ninhada nascida de cada grupo.

Tabela 3. Desempenho de filhotes de ratos Wistar tratados por 40 dias pré-acasalamento com extratos de *Solanum malacoxylon* e de *Nierembergia veitchii*, com vitamina D₃ e com solução fisiológica no teste de natação aos 7, 14 e 21 dias após o nascimento.

Grupo	Desempenho*			0 ^a			1 ^a			2 ^a			3 ^a			4 ^a		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
SM (10,9g/kg/dia)	62	0	0	19	0	0	17	14	0	2	78	1	0	8	99			
NV (10,9g/kg/dia)	68	0	0	12	0	0	15	16	0	5	71	1	0	13	99			
Vitamina D ₃ (3mg/kg/dia)	60	0	0	25	0	0	10	17	0	5	66	1	0	17	99			
Sol. fisiológica	70	0	0	7	0	0	20	34	0	3	62	3	0	4	97			

*Percentual de desempenho no teste de natação aos 7, 14 e 21 dia após o nascimento.

^a Escala quanto ao posicionamento da cabeça em relação à linha d'água, no qual: 0 = nariz debaixo da água; 1 = nariz na superfície;

2 = nariz e topo da cabeça na superfície da água, mas orelhas abaixo dela; 3 = idem ao 2, mas com orelhas na superfície; 4 = mesmo que 3, mas com orelhas acima da superfície da água.

Protocolo II

A [Tab. 4](#) resume os dados das taxas reprodutivas obtidas com os diferentes grupos experimentais. A taxa de parto dos grupos SM e vitamina D₃ reduziu-se com o aumento da dose. Ela manteve-se igual no grupo-controle e nos grupos com as três doses de NV. Também houve redução significativa (P<0,05) na taxa de natalidade com o aumento da dosagem nos tratamentos com SM e com vitamina D₃, e não houve diferença significativa entre os três grupos tratados com NV e o grupo-controle. A dose de 2,25mg/kg/dia de vitamina D₃ (dose intermediária) foi responsável pelo aparecimento de alterações morfológicas macroscópicas em 100% dos fetos. Tais alterações consistiram em aumento de volume de articulações e arqueamento de ossos longos de membros anteriores e posteriores e da coluna. Observaram-se fetos com encurtamento de membros locomotores e alterações na face. Com doses de 10,9 e 21,7g/kg/dia do extrato aquoso de SM e com a dose de 3,75mg/kg/dia de vitamina D₃ não ocorreram partos. Nas doses utilizadas, não foram observadas alterações teratogênicas com o extrato aquoso de NV.

Tabela 4. Taxas reprodutivas (%) após a administração oral de vitamina D₃, de extratos aquosos de *Solanum malacoxylon* e de *Nierembergia veitchii*, em doses crescentes, e de solução fisiológica a ratas durante todo o período de gestação (21 dias).

Característica	SF	Vitamina D ₃ (mg/kg)			<i>S. malacoxylon</i> (g/kg)			<i>N. veitchii</i> (g/kg)		
		0,75	2,25	3,75	5,4	10,9	21,7	5,4	10,9	21,7
Taxa de prenhez, %	100	100	100	90	100	100	100	100	100	100
Taxa de parto, %	100	100	50	0	50	0	0	100	100	100
Taxa de natalidade, %	86,6	92,1	66,6	0	81	0	0	86,4	91,7	82,0
Taxa de teratogenia, %	0	0	100	*	0	*	*	0	2,3	0,1

*Não houve parto.

n = 5 a 10 fêmeas por grupo

Não houve diferença significativa no desenvolvimento ponderal das fêmeas dos grupos tratados com as três dosagens do extrato aquoso de NV, quando comparados aos do grupo-controle. O mesmo foi observado com relação à menor dose de vitamina D₃ testada (0,75mg/kg/dia) ([Fig. 1](#)).

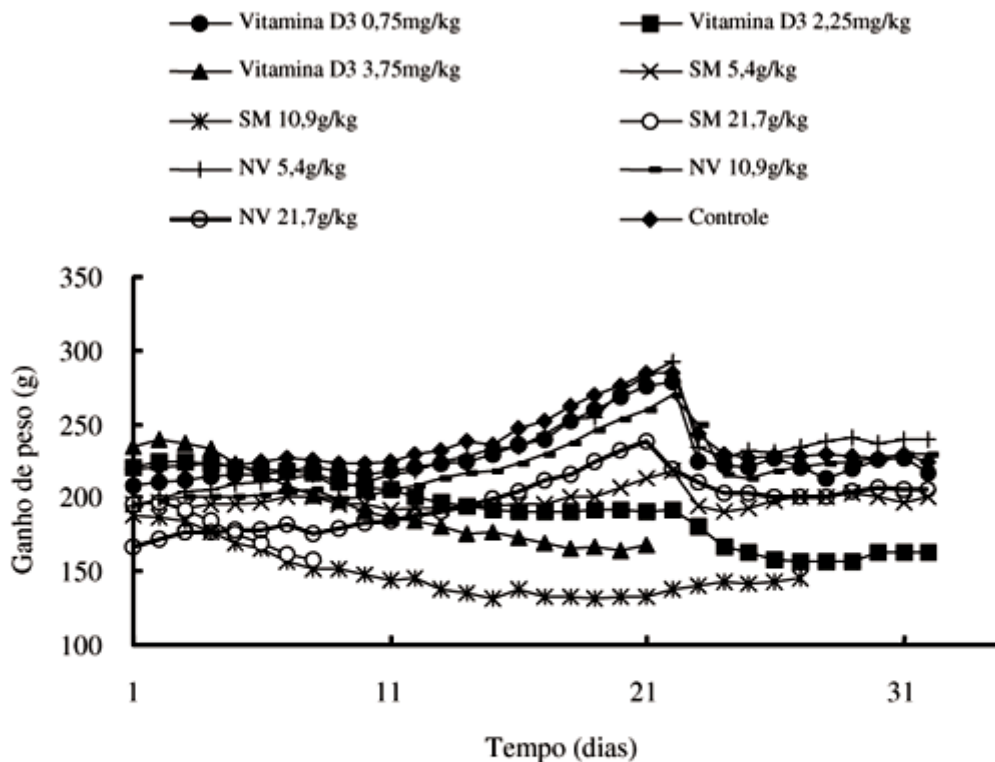


Figura 1. Desenvolvimento ponderal das ratas gestantes desde a cópula (esfregaço vaginal com presença de espermatozoides) até 10 dias depois do parto. Uma vez prenhes, as fêmeas recebiam por sonda gástrica, aleatoriamente, extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* ou de *Nierembergia veitchii*, (equivalente a 5,4; 10,9 e 21,7g de planta seca por kg, por dia), vitamina D₃ (0,75; 2,25 e 3,75mg×kg⁻¹ por dia) e solução fisiológica (controle).

O desenvolvimento ponderal das gestantes foi semelhante em dois grupos tratados com SM (5,4 e 10,9g/kg/dia) e em um grupo tratado com vitamina D₃ (2,25mg/kg/dia). Nestes três grupos houve redução significativa do ganho de peso das fêmeas durante a gestação (Fig. 1).

A dose de 21,7g/kg/dia do extrato aquoso de SM acarretou a morte das fêmeas gestantes, em média, no nono dia de gestação. No grupo tratado com a dose de 3,75mg/kg/dia de vitamina D₃ a morte ocorreu, em média, no 21º dia de gestação (Fig. 1).

Houve redução do número de ratos nascidos nos três grupos tratados com SM (5,4; 10,9 e 21,7g/kg/dia) e em um grupo tratado com vitamina D₃ (3,75mg/kg/dia), quando comparados com o grupo SF (controle). As três dosagens de extrato aquoso de NV e as doses de 0,75 e 2,25mg/kg/dia de vitamina D₃ não resultaram em diferença no número de filhotes nascidos em relação ao grupo SF (Tab. 5).

Tabela 5. Características reprodutivas após a administração oral de extratos aquosos de *Solanum malacoxylon* e de *Nierembergia veitchii*, de vitamina D₃ e de solução fisiológica (SF) a ratas durante todo o período de gestação (21 dias).

Grupo	SF	Vitamina D ₃ (mg/kg)			<i>S.malacoxylon</i> (g/kg)			<i>N.veitchii</i> (g/kg)		
		0,75	2,25	3,75	5,4	10,9	21,7	5,4	10,9	21,7
Copuladas	6	6	6	10	6	6	6	6	5	6
Gestantes	6	6	6	9	6	6	6	6	5	6
Paridas	6	6	6	0	3	0	0	6	5	6
Implantes	12,4±0,2	12,8±0,2	10,6±0,3	11,1±0,3	11,5±0,2	7,3±0,4*	9,0±0,8	12,3±0,2	9,8±0,4	10,8±0,2
Nascidos	11,6±0,2	12,1±0,2	8,3±0,7*	0*	4,8±0,8*	0*	0*	10,6±0,2	9,2±0,4	10,3±0,2
Reabsorções	1,2±0,06	0,8±0,05	2,0±0,6	11,1±0,3*	6,7±0,8*	7,3±0,4*	9,0±0,8*	1,2±0,07	0,5±0,09	0,3±0,14

*Média que diferem do respectivo controle (P<0,05).

O número de implantes uterinos no sétimo dia de gestação foi significativamente reduzido no grupo tratado com a dose de 10,9g/kg/dia do extrato aquoso de SM. Nos demais grupos não houve diferença no número de implantes no sétimo dia de gestação, quando comparados com o grupo SF (Tab. 5).

Houve redução significativa no número médio de filhotes nascidos nos grupos tratados com SM e vitamina D₃. Quanto maior a dose do tratamento, menor o número de nascidos. Essa redução não foi observada nos grupos tratados com NV. De forma inversa, o número de reabsorções embrionárias aumentou com o aumento da dosagem nos grupos tratados com SM e vitamina D₃, aumento não observado nos três grupos tratados com extrato aquoso de NV e no grupo SF (Tab. 5).

DISCUSSÃO

Conhece-se, desde há muito, os efeitos do consumo de plantas calcinogênicas pelos animais domésticos. A presença de vitamina D₃ e seus metabólitos em concentrações variadas acarretam o quadro clínico conhecido como calcinose enzoótica. A alteração da conformação de ossos e cartilagens, a calcificação de tecidos moles, a dificuldade de locomoção e, conseqüentemente, a alimentação levam a um quadro que com freqüência pode acarretar a morte. Todavia, dependendo do estado geral dos animais e da quantidade de planta calcinogênica ingerida, os animais não morrem. A sintomatologia crônica, com manifestação mais branda do que a aguda, é acrescida de infertilidade e de dificuldade de concepção (Dirksen et al., 1973; Dämmrich et al., 1975; Mello et al., 1995).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a redução da fertilidade de animais se deve à redução da condição de saúde como um todo. O extrato produz nítida toxicidade materna e paterna, interferindo no processo reprodutivo. Langeloh et al. (1992) e Marona et al. (1992) mostraram que a deterioração da condição geral de ratas tratadas com extratos das plantas *Ateleia glazioviana* e *Tetrapteryx multiglandulosa* reduz a fertilidade. Neste experimento, a redução da condição geral, tanto de fêmeas como de machos antes do acasalamento, também foi capaz de reduzir a fertilidade dos animais, interferindo negativamente no seu desempenho reprodutivo. Isso fica claro quando se analisam os resultados do experimento do protocolo 1. O aparecimento de sinais de calcinose já nos primeiros dias de tratamento com o extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* e com a vitamina D₃, como emagrecimento, pêlos arrepiados, dificuldade de locomoção, arqueamento de ossos longos e cifose se agravaram, chegando a extremos quando a sobrevivência era duvidosa. Com o extrato aquoso de *Nierembergia veitchii*, os sinais foram mais brandos e tardios. Isso certamente se deve ao fato da menor concentração de substância ativa calcinogênica na planta (Riet Correa et al., 1987; Mello, 1991; Mello & Habermehl, 1992). Apesar disso, as fêmeas desse grupo, à semelhança dos dois anteriores, apresentaram fertilidade reduzida, quando comparadas com o grupo-controle, tratado com solução fisiológica. Dokoh et al. (1983) demonstraram a presença de receptores para 1,25(OH)₂D₃ em ovários de hamster, idênticos aos observados em outros tecidos alvos. Eles incluíram os ovários

entre os tecidos alvos para a vitamina D, além de outros ligados à função reprodutiva como a glândula mamária, a placenta, o útero e a glândula ovígera em aves. Os autores afirmaram haver evidências de que o sistema hormonal da vitamina D está envolvido em fenômenos regulatórios associados à gestação, à lactação e à postura de ovos em aves. Sugeriram que a necessidade de um delicado controle do cálcio no metabolismo ósseo, durante a reprodução, poderia indicar um efeito do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre os hormônios femininos. Alertaram que a ação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em células ovarianas, ao inibir seu crescimento, revelou que o hormônio podia ser responsável pela modulação da diferenciação celular, ou exercia uma influência negativa sobre algumas funções ovarianas. Ainda relacionado com a função reprodutiva nas fêmeas, o processo contrátil da musculatura lisa uterina *in vitro* é marcadamente alterado quando ratas são tratadas por 40 dias com extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* e vitamina D_3 , provavelmente pela modificação da concentração de cálcio nesse tecido (Almeida et al., 1996). Com relação aos machos, a alteração do processo contrátil da musculatura lisa do ducto deferente *in vitro* também é observada quando os ratos são tratados por 40 dias com extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* e vitamina D_3 (Almeida et al., 1996). Merke et al. (1985) demonstraram a presença de receptores nucleares para $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em células de Sertoli e em túbulos seminíferos de ratos e camundongos. Concluíram que o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ influenciou a proliferação e diferenciação celular, e que o número de receptores aumentou na puberdade, paralelamente com a espermatogênese. Baseado nesses achados, é lícito admitir que o tratamento crônico com SM e NV atue de forma mais complexa sobre o processo reprodutivo de machos e fêmeas, não somente por seus efeitos agudos de toxicidade sistêmica. Após o período de administração dos extratos de SM e NV e da vitamina D_3 , quando os animais foram colocados em acasalamento, houve recuperação do estado geral, remissão parcial dos sintomas e restabelecimento do consumo de alimento. Alguns autores já haviam registrado a regressão da sintomatologia quando os animais eram removidos de pastagens que continham plantas calcinogênicas (Tokarnia & Döbereiner, 1974; Barros et al., 1992). Nestes experimentos, o período de recuperação não foi suficiente para que a plenitude da função reprodutiva fosse restabelecida. Barros et al. (1992) acompanharam a evolução da sintomatologia da calcinose em ovelhas, após serem retiradas de pastagens com *Nierembergia veitchii*. Nas quatro fêmeas examinadas, observaram que a fertilidade geral não foi afetada, pois dois dos animais adultos ao início do experimento, conceberam durante a fase ativa da enfermidade e pariram cordeiros saudáveis a termo, voltando a fazê-lo na ordem de parto seguinte. Concluíram que, apesar das evidências encontradas, o pequeno número de casos não permitia uma avaliação conclusiva sobre a fertilidade das ovelhas, pelo menos nas condições experimentais em que se desenvolvia a enfermidade.

Os filhotes nascidos do cruzamento de ratos tratados previamente ao acasalamento não apresentaram anormalidades morfológicas macroscópicas aparentes, embora as ninhadas dos grupos SM e vitamina D_3 tenham sido menores. O tempo para o aparecimento das características evolutivas e o desempenho no teste físico da "natação" não mostraram diferenças entre os grupos tratados e controle. Gerenutti et al. (1992) trataram ratas com *Pteridium aquilinum* durante a gestação e avaliaram o aparecimento de características evolutivas e o desempenho dos filhotes no teste de natação. Constataram que, apesar da perda de peso das fêmeas durante o tratamento, não houve diferença entre o grupo-tratado e o controle. Os autores alertaram para o fato de que a exposição de embriões a certas substâncias químicas pode acarretar distúrbios físicos e comportamentais após o nascimento. O acompanhamento dos filhotes, neste experimento, avaliou essa possibilidade, quando a administração de substância se processava antes da gestação.

No tratamento das fêmeas durante toda a gestação, novamente a deterioração do estado geral (toxicidade sistêmica) ocorreu de forma decisiva para as mortes ocorridas com a dose de 21,7g/kg/dia de SM e 3,75mg/kg/dia de vitamina D_3 . No primeiro, as fêmeas acabaram morrendo, em média, no nono dia de gestação. No último, em média, morriam no 21º dia. Necropsiadas, as fêmeas de ambos os grupos mostravam calcificação intensa no coração e vasos próximos, no estômago, no intestino e no útero. Deve-se ressaltar que as fêmeas não chegavam a experimentar uma recuperação após o estresse cirúrgico a que eram submetidas no sétimo dia de gestação. Para as fêmeas tratadas com SM, todas as dosagens utilizadas foram responsáveis pela toxicidade materna. No caso da vitamina D_3 , a dose de 2,25mg/kg/dia também foi responsável pelos efeitos pós-implantação, uma vez que aos sete dias, quando da laparotomia, foram observados implantes viáveis. No grupo tratado com dose de 3,75mg/kg/dia, a taxa de prenhez de 90% também pode indicar toxicidade pré-implantação, uma vez que na laparotomia não foram contatados implantes

viáveis. O estado geral dos animais deste grupo aponta, também, no sentido da toxicidade sistêmica. No caso do grupo com vitamina D₃ na dose de 2,25mg/kg/dia, o aparecimento de alterações morfológicas fetais (engrossamento de articulações e arqueamento de membros locomotores) confirmam a toxicidade pós-implantação. O mesmo pode ser observado com relação a NV nas doses de 10,9 e 21,7g/kg/dia. Neste caso, as alterações morfológicas foram encurtamento de membros locomotores e anomalias na face. Segundo Lemônica et al. (1996), o período de pré-implantação é considerado um período de "tudo ou nada", isto é, o período durante o qual a exposição materna aos agentes exógenos pode causar tanto a morte do embrião quanto o desenvolvimento normal de fetos até o parto. Na rata esse período vai do primeiro ao sexto dia de gestação, enquanto que o período de organogênese vai do sexto ao 15º dia, ocorrendo nesse período as anomalias morfológicas (Lemônica & Alvarenga, 1994). No caso da administração de SM, provavelmente a redução da dosagem possa igualmente acarretar os efeitos na fase de pré e pós-implantação, como foi observado com NV e com vitamina D₃. Outro aspecto importante, que convém discutir, prende-se ao fato de que diversos autores preconizam a utilização de plantas calcinogênicas e/ou vitamina D como medida preventiva à ocorrência de hipocalcemia pós-parto (Gast et al., 1979; Roux et al., 1979; Kunz & Hänichen, 1983; Fricke, 1985; Buchelt, 1987). Os riscos desta medida correm fundamentalmente por dois motivos, primeiro a concentração de substância ativa nas plantas é variável e incerta, segundo, os efeitos da vitamina D₃ e de seus metabólitos sobre a reprodução não estão completamente elucidados.

CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados neste trabalho pode-se concluir: 1- Os extratos aquosos de *Solanum malacoxylon* e *Nierembergia veitchii* reduzem as taxas de fertilidade e de concepção de ratos, quando administrados previamente ao acasalamento, semelhante ao observado com a administração de vitamina D₃; 2- embora ocorra interferência na fertilidade, os filhotes nascidos de ratos tratados com os extrato citados e com a vitamina D₃ não apresentam modificações no tempo de aparecimento de características de desenvolvimento e têm, também, desempenho físico semelhante aos animais-controle em teste de natação; 3- quando administrado durante a gestação, o extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* interfere na fertilidade e na concepção. O mesmo é observado com a vitamina D₃; 4- nas doses utilizadas não são observadas alterações reprodutivas com o extrato aquoso de *Nierembergia veitchii*, quando administradas durante a gestação, mas provocam o aparecimento de alterações morfológicas nos fetos. Essas alterações também são observadas com a administração de vitamina D₃; 5- as plantas calcinogênicas estudadas, provavelmente pelo teor de vitamina D₃ e seus metabólitos, alteram a função reprodutiva, tanto administradas antes como durante a gestação; 6- a toxicidade sistêmica pode ser a principal responsável pela infertilidade e dificuldade de concepção provocada pelas plantas calcinogênicas. Não se podem descartar, todavia, os efeitos tóxicos específicos sobre os aparelhos reprodutores masculino e feminino, além dos efeitos sobre o feto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C.R.C., LANGELOH A., MELLO, J.R.B. et al. Reatividade da musculatura lisa não vascular em ratos tratados com *Solanum malacoxylon* Solanaceae. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL. 11. 1996, Caxambu. *Anais...*, Caxambu: s.p., 1996. [[Links](#)]
- BARROS, S.S., DRIEMEIER, D., SANTOS, M.N. et al. Evolução clínica e reversibilidade das lesões da calcinose enzoótica dos ovinos induzida por *Nierembergia veitchii*. *Pesq. Vet. Bras.*, v.12, p.5-10, 1992. [[Links](#)]
- BUHELDT K. *Versuche zur Prophylaxe der hypokalzämischen Gebärlahmung mittels Verfütterung von Trisetum flavescens* - *Cobs. Tierärztl. Fak.* 1987. 195p. Diss. [[Links](#)]

- DÄMMRICH, K., DÖBEREINER, J., DONE S.H. et al. Skelettveränderungen nach Vergiftungen mit *Solanum malacoxylon* bei Rindern. *Veterinärmed. A*, v.22, p.313-329, 1975. [[Links](#)]
- DIRKSEN, G., PLANK, P., HÄNICHEN, T. et al. Die enzootische Kalzinose - eine neue Weidekrankheit des Rindes. *Tierzüchter*, v.25, p.150-152, 1973. [[Links](#)]
- DÖBEREINER, J., TOKARNIA, C.H., COSTA, C.B.D. et al. "Espichamento", intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon* no Pantanal do Mato Grosso. *Pesq. Agropec. Bras.*, Ser. Vet., v.6, p.91-117, 1971. [[Links](#)]
- DOKOH, S., DONALDSON, C.A., MARION, S.L. et al. The ovary, p. a target organ for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*, v.112, p.200-206, 1983. [[Links](#)]
- FRICKE, R. *Untersuchungen über die Prophylaxe der Hypokalzämischen Gebärlähmung beim Rind mit Solanum malacoxylon*. Tierärztl. Fak., München. 1985, 214p. [[Links](#)](Diss.)
- GAST, D.R., HORST, R.L., JORGENSEN, N.A. et al. Potencial use of 1,25-dihydroxycholecalciferol for prevention of parturient paresis. *J. Dairy Sci.*, v.62, p.1009-1013, 1979. [[Links](#)]
- GERENUTTI, M., SPINOSA, H.S., BERNARDI, M.M. Effects of backen fern (*Pteridium aquilinum* L Kuhn) feeding during the development of female rats and their offspring. *Vet. Hum. Toxicol.*, v.34, p.307-310, 1992. [[Links](#)]
- KROOK, L., WASSERMAN, R.H., Mc ENTREE, K. et al. *Cestrum diurnum* poisoning in Florida cattle. *Cornell Vet.*, v.65, p.557-575, 1975. [[Links](#)]
- KUNZ, W., HÄNICHEN, T. *Solanum malacoxylon*, p. Investigation on the systemic tolerance of doses recommended for prophylaxis of parturient paresis. *Anim. Res. Dev.*, v.17, p.88-93, 1983. [[Links](#)]
- LANGELOH, A., MAIDANA-LEGUIZAMÓN, F., DALSENTER, P. Potencial abortivo e infertilizante de plantas brasileiras contaminantes ocasionais de pastagens de bovinos e outros herbívoros de interesse econômico. *Pesq. Vet. Bras.* v.12, p.11-18, 1992. [[Links](#)]
- LEMÔNICA, I.P., ALVARENGA, C.M.D. Abortive and teratogenic effects of *Acanthospermum hispidum* D.C. and *Cajanus cajan* L. Millip. in pregnant rats. *J. Ethnopharmacology*, v.43, p.39-44, 1994. [[Links](#)]
- LEMÔNICA, I.P., DAMASCENO, D.C., DI-STASI, L.C. Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.29, p.223-227, 1996. [[Links](#)]
- MARONA, H.R.N., LANGELOH, A., SCHENKEL, E.P. Atividade abortiva de *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilinoideae) em ratas. *Pesq. Vet. Bras.*, v.12, p.81-83, 1992. [[Links](#)]
- MELLO, J.R.B. *Untersuchungen der Auswirkungen von kalzinogenen Pflanzen auf die Elemente Ca, P und alkalische Phosphatase bei Hühnerküken*. Tierärztl. Hochschule Hannover., 1991. 195p. [[Links](#)](Diss.)
- MELLO, J.R.B., HABERMEHL, G. Einfluss ultravioletter Strahlen und klimatischer Bedingungen (Sonneneinstrahlung und Temperatur) auf die kalzinogene Aktivität von *Trisetum flavescens* und *Nierembergia veitchii*. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, v.98, p.441-476, 1991. [[Links](#)]
- MELLO, J.R.B., HABERMEHL, G. Kalzinogene Pflanzen und der Inkubationseffekt durch Pansensaft. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* V.99, p.353-392, 1992. [[Links](#)]

MELLO, J.R.B., ALMEIDA, C.R.C., ZANDER, R. O envolvimento de substâncias com atividade vitamina D na etiologia da infertilidades produzida pela planta calcinogênica *Solanum malacoxylon* Solanaceae. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.22, p.9-19, 1995. [[Links](#)]

MERKE, J., HÜGEL, U., RITZ, E. Nuclear testicular 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in Sertoli cells and seminiferous tubules of adult rodents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v.127, p.303-309, 1985. [[Links](#)]

RIET CORREA, F., SCHILD, A.L., MENDEZ, M.C. et al. Enzootic calcinosis in sheep caused by the ingestion of *Nierembergia veitchii* (Solanaceae). *Pesq. Vet. Bras.*, v.7, p.85-95, 1987. [[Links](#)]

ROUX, R., DAVICCO, M.J., CARRILLO, B.J. et al. *Solanum glaucophyllum* in pregnant cows. Effect on colostrum, mineral composition and plasma calcium and phosphorus levels in dams and newborn calves. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, v.19, p.91-101, 1979. [[Links](#)]

SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. Statistical methods. 5.ed. Ames: Iowa State Univ. Press, 1967. [[Links](#)]

TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J. "Espichamento", intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon*, no Pantanal do Mato Grosso. II. Estudos complementares. *Pesq. Vet. Bras.*, v.9, p.53-62, 1974. [[Links](#)]

WORKER, N.A., CARRILLO, B.J. "Enteque seco", calcification and wasting in grazing animal in Argentine. *Nature*, v.215, p.72-74, 1967. [[Links](#)]

All the contents of this journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution License

Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567
30123-970 Belo Horizonte MG - Brazil
Tel.: (55 31) 3409-2041
Tel.: (55 31) 3409-2042



abmvz.artigo@abmvz.org.br